柑橘黃龍病之發生生態及防治研究

蔡佳欣[1,3] 洪挺軒[2] 蘇鴻基[2]

[1] 行政院農委會農業試驗所植物病理組
[2] 國立臺灣大學植物病理與微生物學系
[3] 通訊作者 e-mail: tsaich@tari.gov.tw

摘 要

1951 年柑橘黃龍病於臺灣北部首次發生，病菌初期只危害臺灣主要柑橘品種如椪柑、桶柑及柳橙等，1971 年後開始感染柚類，並逐步擴及所有品種，顯示病菌系統近幾十年來產生演變。因此本研究以四種鑑別柑橘品種 (椪柑、柳橙、文旦與檸檬) 進行生物檢定，鑑別出目前台灣田間至少有 4 種黃龍病菌系統：系統 I 僅對椪柑與柳橙具病原性且產生典型病徵，爲原始系統；系統 II 對四種鑑別品種皆具病原性與高毒性，並可快速於其內增殖；系統 Ⅲ 僅在椪柑與柳橙引起中度病徵，在文旦出現輕度病徵。系統 Ⅳ 僅感染椪柑及柳橙，但幾無病徵表現。目前田間以系統 II 爲最優勢族群。於田間採集疑似黃龍病樣品中，平均僅約 3 成感染黃龍病，且常與柑橘病毒複合感染。經接種試驗發現，受黃龍病菌與柑橘病毒複合感染之植株，其病徵與植株萎縮程度皆嚴重於僅受到黃龍病單一病原感染株。爲瞭解黃龍病標準病徵，於無病毒紅江橙園區採集各種黃化材料，並依病徵分爲六型，發現以第六型 (黃綠不均斑駁狀) 病徵感染比率最高 (72.3 %)。於柑橘品種對黃龍病菌之抗感性研究顯示，椪柑、桶柑對黃龍病菌最感病；晚崙西亞次之；文旦、檸檬與金柑再次之。各砧木依抗感性可分爲感病型、中度耐病、高度耐病及抗病型四類。另研究發現病菌在植株的分佈情形極不平均且病菌於涼溫之春秋兩季含量較多。化學治療上，本試驗以 Su 與 Leu 1972 年起使用的四環黴素療法，加以改進試驗：首先設計一灌注裝置於室內分析四環黴素與青黴素藥效，以四環黴素效力較佳。之後改進田間灌注方式，以加壓灌注器在 80 磅下，灌注抗生素於田間病柚老柑株，各抗生素配方均可有效降低病株病級數，以四環黴素單劑配方較佳。以 1000 ppm 四環黴素灌注 3 次可達良好治療效果，處理後樹勢恢復，可產生好品質柑果。此藥療法引起暫時性藥害包括新生葉細長、葉脈褐化、葉片焦枯與大量落葉等現象，但皆可於半年後恢復。

關鍵詞：柑橘黃龍病、柑橘黃龍病菌系統、化學療法、柑橘品種

前 言

柑橘黃龍病 (Huanglongbing, HLB) 早於 1943 年便於中國大陸發生，1947 年亦於南非發生並以 greening 病名發表，台灣於 1951 年起開始嚴重發病。經松本教授等 (1961) 根據其病徵稱之爲立枯病 (Likubin)。因當時僅知此病可由接穗

傳染，對病原及媒介昆蟲尚不瞭解因此十年內此病大發生影響柑橘產業甚鉅，1960 年全台普查 103 萬調查株中黃龍病占 22% (邱及蔡, 1976)。1971 年台南地區原本抗病之文旦首度發現黃龍病，至 1975 年該地區文旦樹普遍黃化 (蔡, 1978)，至 1979 年證實此病已演化至可感染柚類 (Su & Wu, 1979)。此病病原研究耗時多年，直至黃 (1987) 利用電子顯微鏡方確認此病原爲多型性 (pleomorphic) 之營養苛求細菌 (fastidious bacteria)，呈長桿狀，大小約 350-550 x 600-1500 nm，外包薄壁 (厚約 20-25 nm)，以行出芽生殖爲主，寄生於維管束篩管細胞，菌體可變形通過篩管細胞而蔓延全株，爲系統性病原細菌 (圖 1)，學名爲 *Candidatus* Liberibacter asiaticus。植株一旦染病將導致產量降低，果實品質差，壽命減短，無經濟生產價值。由於此病可經由帶菌接穗或柑橘木蝨媒介傳播 (Capoor *et al.*, 1967)，媒介傳播則成爲田間黃龍病蔓延主因。因此防治的重點在於種植健康苗木與避免媒介昆蟲。全球各先進國家柑橘產區極重視病毒與類病毒病害的傳播，美國早在數十年前即採行健康種苗制度。台灣早年並無此制度，均由種苗商自行嫁接繁殖後出售，因此台灣目前田間各種系統性病害可能亦已蔓延，包括有柑橘黃龍病、柑橘萎縮病 (citrus tristeza) 與柑橘破葉病 (citrus tatter leaf)，所以到底目前此類病害在台灣各產區的危害情形亦需瞭解。

以往黃龍病的生態研究受限於缺乏高敏感度的偵測技術，許多學術上的問題與防治策略無法解決，目前國內已開發之黃龍病 PCR 偵測 (Hung *et al.*, 1999)，可用於偵測柑株及木蝨體內之病菌，對解明黃龍病發病生態與防治上相當有助益，因此本研究擬從探討目前田間黃龍病菌之感染特性，進行台灣黃龍病菌之系統鑑別，以及利用分子診斷技術，廣泛偵測採集田間各品種柑橘植株，對台灣柑橘目前最重要之三種系統性病害 (黃龍病、萎縮病及破葉病) 之分佈與感染情形作一確切之瞭解，並對黃龍病菌與柑橘病毒之複合感染對柑橘生長之影響作一研究。此外，本文亦研究各經濟品種與砧木對黃龍病之抗感性，以作爲綜合防治與產業利用之參考。在此病實際的防治方面，控制媒介昆蟲爲主要防治策略，但若感染源一直存在將使得防治媒介昆蟲之策略失敗。實際上台灣並無法令可強制農民銷毀罹病病株，爲此問題我們亦從事抗生素對黃龍病株之治療試驗，並以 PCR 長期追蹤其療效，除希望提高柑橘品質之外，更期能以此法達到長期控制病株，使媒介昆蟲無法再傳播此病。雙管齊下，盼此病能降低至不造成柑橘生產者痛苦。

黃龍病菌之病原性系統鑑別

黃龍病 1951 年自台灣北部開始發生後，迅速破壞台灣柑橘產業，椪柑、桶柑及甜橙普遍嚴重發生，至 1971 年原本被視爲抗病的台灣文旦亦開始出現了黃萎的病徵而被認爲與 HLB (Huang & Chang, 1980)，顯示此病菌的病原性已發生演變。本研究選用 4 種不同抗感病性之柑橘鑑別品種分別爲椪柑、柳橙、文旦柚與檸檬。椪柑與柳橙爲自 1951 年起最先發現發病之罹病性柑橘品種 (Matsumoto *et al.*, 1961)，文旦柚及尤利加檸檬爲過去被認爲對黃龍病抗病及耐病之品種。以上述 4 種鑑別植物之實生苗作爲嫁接接種之鑑別植物，對收集自全台各主要產地之不同品種之病原菌進行鑑別，各產地分布爲，新竹縣主要栽植椪柑及海梨柑，苗

栗縣地區主要栽種桶柑以及椪柑，柳橙則主要產在台南與雲林縣，以文旦爲主之各種柚類則主要分佈在雲林縣及花蓮縣，金柑主要種植在宜蘭縣，檸檬則主要產在屏東縣。

黃龍病菌分離株之系統分類主要是依靠 4 種柑橘鑑別品種之致病性與毒性來進行判定。而目前我們已可將黃龍病菌分離株分爲 4 個系統。經接種 12 月之後，病原系統 I 可於椪柑與柳橙引起嚴重病徵，但卻無法感染文旦與檸檬 (圖 2, strain I)，經 PCR 追蹤並無黃龍病菌於文旦與檸檬中增殖 (表 1)。病原系統 Ⅱ 則爲一具高毒性與致病性之病原系統，可引起所有鑑別植物嚴重病徵，包含有葉片黃化斑駁、捲曲、葉脈黃化 (圖 2, strain II) 以及嚴重矮化。並於 PCR 偵測中皆可有強烈繁殖訊號。病原系統 Ⅲ 則爲一中間型系統，可引起中度病徵，僅可感染椪柑、柳橙及文旦 (圖 2, strain Ⅲ)。其所造成之病徵爲葉片褪色 (leaf-chlorosis) 與葉脈輕微之突起，但不造成黃化斑駁之黃龍病典型病徵。病原系統 Ⅳ 則爲一弱系統，可感染椪柑、柳橙幾無病徵表現，只造成輕微均勻褪色，但無法感染文旦與檸檬，田間稀有發現 (圖 2, strain Ⅳ)。目前經調查田間以病原系統 Ⅱ 爲分布最優勢之族群。

台灣地區柑橘黃龍病與柑橘病毒複合感染之研究

一、HLB 之發生及其與萎縮病毒 (CTV) 或破葉病毒 (CTLV) 複合感染情形

台灣地處熱帶與亞熱帶地區，柑橘品種繁多，本次調查各大柑橘產區，疑似 HLB 病徵之各品種柑橘植株，偵測 HLB、CTV 與 CTLV 後，結果歸納於表 2，由台灣北部新竹，苗栗之主要椪柑及桶柑產區內共偵測 146 棵具有黃化病徵之椪柑與桶柑病株後，發現事實上約有 30% 之病材料對 HLB-PCR 呈現陽性反應；並且感染 HLB 之植株中，HLB 與 CTV 複合感染超過 65%，HLB、CTV 與 CTLV 三者複合感染亦約有 30%。另也發現目前新竹地區受 HLB 感染之椪柑、桶柑病株亦幾乎是 100% 受 CTV 感染，30% 以上受 CTLV 感染。

雲林縣與花蓮縣爲文旦柚、白柚、西施柚、雜柚之主要產區，統計此兩地區黃化病柚 267 棵中有 30-45% 爲 HLB 感染，而 HLB 病株與 CTV 複合感染在各品種柚類有極大的不同，在文旦、白柚、西施柚之 CTV 複合感染率甚低只有 3-8%，然 HLB 與 CTLV 之複合感染卻超過了 40%。在葡萄柚及明尼桔柚之 HLB 病株則有不同的情況，HLB 與 CTV 複合感染爲 60-77.8%，HLB、CTV 及 CTLV 三者共同複合感染者佔 22-30%，因此兩者合計 HLB 病株約 90-100% 受 CTV 感染。

嘉義縣竹崎與雲林縣古坑鄉爲台灣最大之柳橙產區，其田間衰弱黃化之柳橙病株亦約 30% 感染 HLB，然其單獨與 CTV 複合感染者不多，僅 8-10%，但同時與 CTV 及 CTLV 感染者竟超過 90%，表示本國之柳橙產區除 HLB 感染嚴重外，其 HLB 柳橙病株竟又幾乎被兩種柑橘病毒所感染。

金柑爲宜蘭縣之主要經濟作物，過去幾無 HLB 自然感染之報告，近年已被

證實台灣金柑亦開始遭受 HLB 侵害 (Tsai *et al.*, 2006)，其目前在田間的感染情形，則尚無任何報告。本次採集宜蘭縣各地之主要金柑產區共 115 黃化金柑病株，發現約 10% 可由 HLB-PCR 偵測到 HLB 原菌之存在，其中 HLB 與 CTV 之複合感染有 33%，HLB 單獨與 CTLV 複合感染者則無發現，但三者共同感染者高達 66.7%，因此兩者合計 CTV 感染 HLB 金柑病株達 100%，而 CTLV 感染 HLB 金柑病株亦有 60% 以上。

檸檬生產地主要集中在屏東，目前在田間黃化疑似 HLB 之檸檬病株 53 棵中，經檢驗超過 50% 已感染了 HLB，完全無 CTV 複合感染的發現，但是依然有 35.7% 與 CTLV 複合感染。另外本次亦調查了位於屏東種植紅江橙無病種苗園出現黃化或衰弱之 3 年生病株共 127 株，發現亦有 29% 受 HLB 感染，然並無發現與 CTV 或 CTLV 複合感染的情形。

二、黃龍病與柑橘病毒複合感染對柑橘生長及黃龍病病徵表現之影響

由於目前台灣田間柑橘植株普遍遭受 CTV 與 CTLV 之感染，雖無明顯病徵，但其對植物本身生長勢及是否會造成黃龍病病徵加重則爲急待瞭解之問題，由接種試驗結果可知，當柑橘同時接種 HLB 與柑橘病毒時造成矮化萎縮最爲明顯，且其葉黃化病徵進展最快，並較快發展成葉全黃之嚴重病徵。單獨接種黃龍病所造成之矮化程度次之，而病毒雖與黃龍病一樣造成植株萎縮之病徵，但並不會像黃龍病一樣葉片嚴重黃化情形，而是呈現輕微褪色的現象。因此結果顯示柑橘病毒的存在會與黃龍病菌具協力作用，加速黃化病徵的表現。

黃龍病田間標準病徵型的研究

柑橘黃化植株雖與 HLB 相關，但並非皆由 HLB 所引起，因田間黃化病株甚多，病徵種類多變，極易與 HLB 病徵混淆，加上其它系統性病害複合感染嚴重，因此本試驗選定定植無病毒種苗園區共採集 173 個黃化材料，並依照不同病徵將其分爲 6 種類型 (圖 3) 並確認無病毒複合感染者始列入分析，第一型：葉片輕度褪色之 41 個病材料中，僅 2 個 (4.8%) 爲 HLB 感染；第二型：成熟葉葉脈間葉肉對稱黃化 (似缺鋅) 之 8 個病材料，經檢測並無 HLB 之感染；第三型：脈間葉肉不均勻之褪色 (似缺錳) 之 27 個病材料中有 4 個 (14.8%) 爲 HLB 感染。第四型：葉脈均勻黃化但葉肉保持綠色或淡綠色 16 個樣本中有 8 個 (50%) 爲 HLB 感染。第五型：整片葉片均勻黃化，成熟老葉僅主脈維持綠色，年輕成熟葉變小且全黃，25 個病材料中 12 個 (48%) 爲 HLB 所感染。第六型：葉脈與葉肉皆呈現黃綠不均勻之斑駁狀病徵，47 個病株中有 34 個 HLB 感染 (72.3%)，爲所有病徵型中最高。因此可瞭解第六型斑駁型爲黃龍病之標準病徵。

柑橘黃龍病各寄主對黃龍病之抗感性試驗

一、黃龍病菌於各柑橘品種內增殖速率與病株病徵發展速率

各臺灣經濟品種包括椪柑、桶柑、甜橙、文旦與金柑，接種 HLB 後，追蹤

其病原菌增殖速率與病級數進展 (病級數由輕至重分 0-3 級)。接種後發現，椪柑與桶柑最爲感病，黃龍病 PCR 訊號與病徵最快出現，於第 6 個月時出現典型斑駁狀之 3 級病徵。其次爲甜橙，第 3 級之典型病徵至第 8 個月以後方於少數葉片出現。文旦與檸檬則屬耐病品種，第 10 個月時方有少數病葉達到第 3 級，大多數葉片仍僅第 2 級病徵。金柑則是最耐病之經濟品種，PCR 訊號最晚出現，且其增加速度緩慢一直至 12 月皆維持較低濃度狀態。金柑葉片之病徵表現亦相當緩慢，不容易出現典型之黃龍病斑駁狀病徵，病級數亦多維持第 2 級。

二、黃龍病菌於各柑橘砧木內增殖速率與病株病徵發展速率

測試 9 種國內外常用砧木及 2 種非柑橘類但具砧木潛力之烏柑子 (*Severinia buxifolia*) 與木蘋果 (*Limonia acidissima*)，追蹤病徵進展及 PCR 強度發展 1 年，依照葉部病徵級數與生長樹勢之耐病程度之影響，可將其歸納爲 4 型：(1) 感病型:台灣最普遍使用之酸橘 (Sunki mandarin)、四季橘 (Calamondin) 以及中國大陸常用之枸頭 (Kau Tou sour orange) 砧木對黃龍病相當感病自接種後葉片最快開始出現輕微褪色病徵，至第 10 個月時病徵已發展達第 3 級典型斑駁病徵，並具強烈 PCR 偵測訊號。(2) 中度耐病： Volkamer Lemon, Rangpur Lime, Rough Lemon 及 *Citrus macrophylla* 接種黃龍病第 8 個月病葉方出現葉片褪色或缺乏營養之黃化病徵病徵，至第 12 個月時，成熟葉可測得中等 PCR 訊號，葉部病徵級數亦多在維持在第 2 級之中度病徵。另一種芸香科植物烏柑子 (*Severinia buxifolia*) 與柑橘亦有良好親合性，可作爲柑橘砧木，但於接種後 6 個月後可出現嚴重斑駁病徵，顯示其對黃龍病亦感病，然而隨著時間拉長，其葉部病徵有慢慢減輕的現象而至均勻褪色後穩定，因此仍將其歸類爲中度耐病。(3) 高度耐病：Troyer citrange, Swingle citrumelo 接種後一年除葉片縮小外，幾無任何黃化病徵出現，病級數屬第 1 級。PCR 偵測亦發現病原濃度一直維持在較低濃度狀態，因此將其歸爲高度耐病砧木。(4) 抗病型：木蘋果 (*Limonia acidissima*) 接種後，於接種後第 8 個月始能偵測到微弱之訊號，並具有輕微之黃化之病徵，但其微弱訊號相當不穩定，12 月時病菌之 PCR 訊號消失，故歸類於抗病型。

黃龍病菌於植物各部位之分佈及四季之消長變化

由田間 3 株無病毒複合感染之紅江橙黃龍病株採得之不同成熟度之葉片比較病菌濃度，可發現成熟葉與老葉中病菌的含量最高，而成熟葉之 PCR 強度似比老葉稍微略強但整體來説差異很小。幼葉次之，但濃度大幅減少，嫩芽最少且部份偵測不到。而若以葉片內之中肋與葉肉比較比較，中肋之濃度則大於葉肉。以相同處理方法萃取莖皮、花、果實、基幹皮層及根部，並經電泳分析後可發現病原濃度最高的地方在於果實，其次是成熟葉、老葉與莖皮，再其次爲根，幼葉中最低而新芽很少偵測到，基幹皮層中側不到病菌。於各季節之濃度變化，若以成熟葉爲基準，各季節均測到相當量而涼溫秋季與春季較高，而以高溫夏季及低溫冬季較低。

黃龍病之化學治療法

黃龍病自被發現與柑桔篩管內原核細菌有關以後，開啓了利用抗生素來治療此病的研究，包括有噴灑四環黴素 (tetracycline hydrochloride) 抑制葉部的病徵、以抗生素浸泡枝條或接穗的方式及點滴灌注四環黴素於病株方式治療此病 (Martinez *et al.*, 1970；Schwarz & van Vuuren, 1971；Su & Chang, 1976)。由於防治此病雖以媒介木蝨爲主要防治策略，但因田間病株眾多，耐病品種柚類、檸檬等罹病後仍可存活數年之久，尤其是 20 年以上的老柑株 (俗稱老叢)，在農民捨不得砍除的情況下，往往成爲傳染源，因此研發改良抗生素灌注法治療病株並減少傳染源。

一、以灌注裝置法測試抗生素之藥效

首先在實驗室中模擬實際田間注射情形，設計一灌輸裝置，利用抽氣馬達以負壓吸引不同濃度之四環黴素與青黴素後進入柑橘病枝條中，將處理過之植物病組織嫁接至柳橙實生苗進行病菌之生物檢定，經 6 個月後觀查黃龍病徵以及檢測黃龍病菌之繁殖與否。本試驗發現當四環黴素濃度濃度達到 10 µg / ml (ppm) 以上時，不論以文旦或茂谷爲接種源皆無黃龍病菌增殖於柳橙指示植物中，柳橙指示植物亦無病徵的出現，即表示具殺菌之藥效。然而青黴素需至 1000 µg / ml 以上時方能完全的抑制發病，而殺菌效果由此可知四環黴素之效力約比青黴素好 10-100 倍。

二、田間灌注藥劑配方試驗

本試驗分別在嘉義、斗六、花蓮三地進行大規模之臨床試驗。注射時採用商品化之改良式高壓灌注器，取代早期重力點滴法，可於灌注器內加入高壓 (壓縮空氣)，使器內抗生素溶液快速注入樹體內 (圖 4)，可大量使用於處理田間黃龍病之病株。藥劑配方以四環黴素爲基礎，配製各種四環黴素與其他藥劑混合之複方進行試驗比較，共計有 (1) 四環黴素 (tetracycline-HCl)，(2) 四環黴素+青黴素 (penicillin-G sodium)，(3) 四環黴素＋harpin，(4) 坊間四環黴素 (當地農民提供)，(5) 四環黴素＋青黴素 ＋harpin，(6) harpin (harpin 係誘導抗病劑)，各試驗地區以不同組合及劑量進行試驗，注射後效果則以黃龍病菌 PCR 檢測追蹤與病株病級數進展評估。病級數以病樹黃化葉所佔比例共分 5 級 (0:無病徵。I: 0-25% 葉黃化。Ⅱ: 21-50% 葉黃化。Ⅲ: 51-75% 葉黃化。Ⅳ: > 76% 葉黃化及梢枯)。

田間實際灌注試驗於各地之柚類園進行，以具不同黃龍病病級數 (Diseae index, DI) 之柚病株進行藥劑灌注試驗，以上述之配方處理，灌注後發現，經 3 次灌注者追蹤 1 年半，含有四環黴素之各配方均能有效的降低黃龍株之病級數。以 1000 ppm 之四環黴素單劑 (3 公升/每棵) 灌注 20 年生以上之病柚老柑株 3 次，可達到良好的治療效果，以 PCR 追蹤 1 年半皆無再發病，治療效果優於僅施藥 1 次之病株，且 3 次灌注施藥對任何 DI 之病株均可達良好的治病效果，於 4 種不同 DI 之黃龍病株，皆可恢復至幾無病徵的情形。四環黴素與其它藥劑混合之複方，注射後植物之生長勢亦顯著提升，枝葉茂密，病級數下降至 0 或

I 級，但病株再發病的比率有時高於四環黴素單劑處理者。單獨灌注 harpin 者，則無明顯的抑制作用，病株仍繼續產生明顯葉部與果實病徵，與對照組相同，故 harpin 無治療效果。而經灌注各抗生素配方後之病株其柚果品質改善，幾乎皆無病徵之表現，其相較於未灌注者果實重量較重，甜度明顯上升，酸度降低，甜度/酸度比上升，與健康對照接近。

然而此 3 次灌注高劑量四環黴素與其混合複方的方法，會引起暫時性的藥害，如新生葉細長、葉脈褐化、葉片焦枯與大量落葉等現象，但可於半年後慢慢恢復正常生長。

討 論

台灣位於熱帶與亞熱帶之交界，爲北迴歸線通過之最大島，因此北部屬於亞熱帶氣候，南部則屬於熱帶氣候。此外中央山脈群縱貫全島，將台灣區隔爲東西兩個部分，這個特別的地理特性使得台灣各地之氣候變化更加明顯，亦使得柑橘品種更加多樣化。例如椪柑與桶柑集中在台灣北部，文旦集中在台灣東南與西南部，檸檬種植在台灣最南部，而金柑種植於西北部。因此多變的氣候與柑橘品種，增加了病原菌演化的機會。在此研究中，首次將台灣亞洲型黃龍病菌分系統族群以生物鑑別爲 4 個型，病菌系統 I 只對椪柑、桶柑與柳橙產生嚴重之黃龍病徵，而不對文旦與檸檬反應。這個現象與 1951-1970 年之台灣田間觀察黃龍病只在椪柑、桶柑及柳橙發生之結果相同，因此此系統應爲原始型黃龍病菌系統。黃龍病爲一種似病毒之系統性病害，由無性繁殖之種苗及木蝨媒介昆蟲傳播，此種寄主品種侷限的情形也同樣發生在柑橘病毒上，以柑橘萎縮病毒 (CTV) 爲例，CTV 柚類莖陷系統 (Pum/SP) 只能侷限在柚類並引起嚴重矮化、葉片捲曲及莖部凹陷病徵。而甜橙莖陷系統 (SO/SP)、寬皮柑莖陷系統 (Mand/SP) 與一般之苗黄系統 (SY) 則無法危害柚類 (Tsai *et al.*, 1993)。相較於 HLB 系統 I 感染僅侷限於寬皮柑 (mandarin) 及橙類，系統 Ⅱ 可危害各柑橘品種，尤其可危害柚類並快速增殖引起嚴重病徵。在田間，此優勢病菌系統 Ⅱ 可危害各品種產生典型黃龍病徵，尤其是其可感染耐病性之柚類與檸檬品種，因此目前台灣南部隨處可見文旦病株，而病徵強烈者，經病原性與毒性分析皆屬於系統 Ⅱ。系統 Ⅲ 在田間通常顯現中間型病徵或弱病徵，此田間觀察結果亦與毒性分析結果一致。系統 Ⅳ 爲一弱系統，其在田間病株亦幾乎不產生病徵，只見均勻之輕微褪色，經毒性分析後發現此系統的確不產生病徵可維持一年以上，且病菌增殖速率緩慢且只能維持在低濃度。

台灣自 1951 年發生 HLB 以來至今已超過 50 年，然至目前 HLB 仍分佈在田間而成爲柑橘生產之限制因子。在本研究發現田間黃化衰弱之各品種柑橘病株約有 30% 以上爲 HLB 所引起，而以耐病品種之文旦、檸檬感染率較高，金柑最低。雖然目前已知此病由木蝨所傳播，然經數十年卻無法將其壓制，目前並已擴散至全國各地。由本研究可瞭解其原因除媒介昆蟲傳播外，更重要之原因爲傳染源一直存在於田間無法去除。在椪柑與桶柑產區常可發現路邊或是田與田之交界處常有零星幾棵中度或輕度黃化之文旦分佈，經 HLB-PCR 檢測其感染

HLB 達 70-80% (表 2)，相同的情形亦發生在柳橙與金柑產區，由於農民常少量雜種些耐病品種，其可感染多年而不死亡，因此往往成爲主要之感染源，反而影響了主要品種之生產。椪柑、桶柑、柳橙過去即被認爲對 HLB 敏感之品種 (da Graca, 1991; Miyakawa, 1980)，再加上這些感病品種幾乎是 100% 感染 CTV，而 CTLV 亦普遍感染 30% 以上，因此 HLB 與病毒複合感染的結果，似亦可解釋田間感病品種快速萎凋死亡之另一原因。而柚類與檸檬產區之黃化病株相對於感病品種，則有較高的比率感染 HLB，經查訪農民瞭解其感染 HLB 已數年之久，但在其果實未完全失去商品價值之前，大部分之果農大多不願更新，尤其以種植文旦之農民普遍認爲“老叢”文旦，果肉細緻，甜度較高，因此超過 30 年之老柚樹，縱使感染 HLB 亦捨不得去除。另一耐病品種檸檬，雖然感染 HLB 會使其產果量下降，果實變小，但由於消費者只取其酸果汁，因此對果實品質影響尚可忍受，也造成檸檬植株淘汰率低，病株四處分佈，除造成生產成本增加，也加速 HLB 擴大蔓延於整個產區，更造成其他對 HLB 敏感之柑橘品種不易在此區種植。爲促使台灣柑橘產業升級，2004 年行政院農委會動植物防疫檢疫局頒佈「柑橘無指定疫病蟲害種苗驗證作業須知」，並輔導種植新健康柑橘，以期逐步淘汰田間已感染黃龍病或柑橘病毒之病株。本試驗亦研究多種砧木對 HLB 的抗感性，期能加強植株抗性，配合健康種苗制度，提升柑橘產業。砧木的試驗中發現，國內常用之酸桔與四季橘爲對黃龍病敏感之砧木，多用來繁殖椪柑、桶柑及甜橙類對黃龍病敏感之商用品系，因此一旦遭受感染往往在很快的時間病菌便遍布病株地上與地下部而快速敗亡，耐病或抗病砧木的使用可使病菌於根部濃度降低較不易繁殖擴散，增加植物耐病性，並可在發病初期便給予適當的抗生素治療，如此將可延長柑橘園之生產年限。檸檬類之砧木以本次溫室試驗結果可說是相當耐病，病徵亦不強烈，其中粗皮檸檬及 Volkamer Lemon 於外國較常用，而廣東檸檬則爲國內常用砧木，此類砧木除對黃龍病具耐病性外，另外對萎縮病毒 (CTV) 亦有強抗病性，然而此三種耐病砧木對鱗砧病 (CEV) 及疫病感病爲其弱點。枳橙類係橙類與枳殼之雜交種，最有名的有 Rusk, Troyer 及 Carrizo，本次所使用的 Troyer 爲美國加州常使用之砧木，在台灣並不常用，本試驗證實此類砧木遭黃龍病感染大多僅出現小葉情形而不黃化，亦可維持不錯之生長勢，極具利用價值。枳柚經本試驗證實亦爲對黃龍病具高耐病性砧木，此外其並具抗萎縮病毒 CTV、疫病菌、線蟲、耐寒、耐澇及耐鹽等特性，因此成爲世界搶手之砧木，可惜此類砧木對柑橘破葉病敏感，以枳殼或其雜交種 (枳橙或枳柚) 爲砧木之柑苗受破葉病毒 (CTLV) 感染時，會造成穗砧癒合部產生凹陷病徵，並使植株矮化 (Calavan *et al.*, 1963；Garnsey, 1970；Miyakawa, 1978)。而國內也因田間植株普遍帶有 CTLV 而使得這類良好砧木無法使用，甚爲可惜，不過由於柑橘脱毒技術的成熟，健康種苗的使用將可克服此 CTLV 危害的困難，因此此類砧木極具產業應用價值。木蘋果爲目前爲止所找出唯一對黃龍病具強抗病力之砧木，由於其非屬於柑橘屬，因此嫁接其上之柑橘接穗生長緩慢，其可能具有矮化樹種的潛力，但是否適合產業應用仍需研究評估。

本試驗重啓抗生素之治療試驗，期能解決目前田間黃龍病蔓延不止的情形以

及挽救柑橘老病株，使其持續生產高品質果實。因此在注射技術上的改進爲，(1) 以高壓灌注代替過去之重力灌注法：此法大大減少灌注時間，依照過去重力灌注法 500 ml 需灌注 3-7 天 (蔡及詹, 1978)，若以高壓法則 30-50 min 即可完成，再者四環黴素爲一光敏感性藥品，經陽光照射半天至 1 天即氧化，由淺黃變至深褐色，因此重力灌注法之藥劑在田間放置超過兩天效力可能已經很低了。(2) 提高灌注量與次數：本次抗生素灌注次數則改變過去單次灌注或只灌注發病枝，以 3 次高劑量及高壓力法全面連續灌注，發現確實能使其藥劑的分佈達到相當均勻的效果，經 1 年半幾乎皆恢復正常生長。甚至連達到病級數 IV 級全黃 + die back 程度，農民已經準備砍除之 30-50 年生罹病老株竟也可以此法恢復旺盛，並結下品質良好之果實，改善過去之報告柑橘老株治療效果差 (Schwarz *et al.*, 1974) 以及台灣文旦病株樹齡超過 20 年或發病程度中上之黃龍病株灌注效果不明顯之問題 (蔡, 1981)。

引用文獻

邱仁璋、蔡謀祐。1976。豐年 26: 20-21。

黃安利。1987。柑橘立枯病病原菌之形態與消長動態之電顯研究。臺灣大學植物病蟲害研究所博士論。148 頁。

蔡雲鵬。1978。興農月刊 109: 23-25。

蔡雲鵬。1981。四環黴素對文旦果實品質之影響。果農合作 408: 18-20。

蔡雲鵬、詹芳雄。1978。柑桔立枯病壓力灌注鉑黴素試驗。第 14 頁。關西柑橘試驗場 66 年年報。48 頁。

Calavan, E. C., D. W. Christiansen, and C. N. Roistacher. 1963. Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstock. Plant Dis. Rep. 47: 971-975.

Capoor, S. P., D. G. Rao, and S. M. Viswanath. 1967. *Diaphorina citr* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. Indian J. Agr. Sci. 37: 572-576.

da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109-136.

Garnsey, S. M. 1970. Viruses in Florida's Meyer lemon trees and their effects on other citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc. 83: 66-71.

Huang, C. H., and C. A. Chang. 1980. Studies on the relation of mycoplasma-like organism with the decline of Wentan pummelo in Taiwan. J. Agric. Res. China 29: 13-19.

Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 147: 599-604.

Martinez, A. L., D. M. Nora, and A. L. Armedilla. 1970. Suppression of symptoms of citrus greening disease in the Philippines by treatment with tetracycline antibiotics. Plant Dis. Rep. 54: 1007-1009.

Matsumoto, T., M. C. Wang, and H. J. Su. 1961. Studies on Likubin. 121-125 pp. *In* Proceedings of 2nd conference of the international organization of citrus virologists. W. C. Price ed. University of Florida, Gainesville, 265 pp.

Miyakawa, T. 1978. A bud-union disorder of Japanese citrus on Poncirus trifoliate rootstock caused by tatter leaf virus. Rev. Plant Prot. Res. 11: 1-10.

Miyakawa, T. 1980. Experimentally induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 46: 224-30.

Schwarz, R. E., J. N. Moll, and S. P. van Vuuren. 1974. Control of citrus greening and its psylla vector by trunk injections of tetracyclines and insecticides. 26-29 pp. *In* Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. L.G. Weather, and M. Cohen, eds. University of California. Berkeley. 232 pp.

Schwarz, R. E., and S. P. van Vuuren. 1971. Decrease in fruit greening of sweet orange by trunk injection of tetracyclines. Plant Dis. Rep. 55: 747-750.

Su, H. J., and S. C. Chang. 1976. The responses of the likubin pathogen to antibiotics and heat therapy. 22-26 pp. *In* Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. E. C. Calavan, eds. University of California. Riverside. 227 pp.

Su, H. J., and R. Y. Wu. 1979. Preliminary study on the etiology of Wentan pomelo decline. Natl. Sci. Counc. Sym. 1: 45-57.

Tsai, C. H., H. J. Su, Y. C. Liao, and T. H. Hung. 2006. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") infecting kumquat in Taiwan. Plant Dis. 90: 1360.

Tsai, M. C., H. J. Su, and S. M. Garnsey. 1993. Comparative study on stem-pitting strains of CTV in the Asia countries. 16-19 pp. *In* Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. P. Moreno, J. V. da Graca, and L. W. Timmer, eds. University of California, Riverside. 471 pp.

The disease ecology and control of citrus huanglongbing

Chia-Hsin Tsai[1,3], Ting-Hsuan Hung[2], and Hong-Ji Su[2]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Taichung, Taiwan, ROC
[2] Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC
[3] Corresponding author, e-mail: tsaich@tari.gov.tw

Abstract

Huanglongbing (HLB) first occurred in northern Taiwan in 1951. Previously the HLB pathogen infected main citrus cultivars in Taiwan such as Ponkan mandarins, Tankan tangors and Liucheng sweet oranges whereas it did not infect pummelos. However, HLB pathogen began to infect pummelos in 1970s implying that the evolution of the pathogenicity occurred in recent decades. This study was designed to differentiate the strains of HLB bacteria (HLBB) through the bioassays with four indicator hosts. Four different HLBB strains were identified based on the results of their pathogenicity and virulence on indicator plants. Strain I was only pathogenic on mandarins and sweet oranges by inducing typical HLB symptoms. Strain Ⅱ was pathogenic with high virulence on all differential cultivars with fast multiplication rates. Strain Ⅲ only caused intermediate symptoms on mandarins and sweet oranges and mild symptoms on pummelos. Strain Ⅳ was a mild strain which could only infect but caused no symptoms on mandarins and sweet oranges. Strain Ⅱ was prevalent in fields. In field surveys, about 30% of citrus samples exhibiting yellows symptoms were infected by HLB and were popularly mix-infected with citrus viruses. Plants with mix-infection exhibited more severe symptoms than those infected only by HLBB. In order to understand the relations between HLB and various yellows symptoms showing in trees, samples of 6 different symptomatic patterns were collected from virus-free sweet orange field for comparison. After HLB inspection, the highest incidence of HLB was found in type 6 (72.3%). In the study of resistance/susceptibility of citrus cultivars to HLB disease, Ponkan and Tonkan were the most susceptible, Valenica sweet orange showed moderate in susceptibility, and Wentan, Eureka lemon and kumquat were tolerant cultivars. According the disease index, the rootstock cultivars were categorized into 4 types; they were susceptible, moderate tolerant, highly tolerant, and resistant type. In addition, the distribution of HLBB in infected trees was diverse and the seasonal dynamic of HLBB population was higher in spring and autumn. In chemotherapy, we improved the transfusion method based on Su and Leu's 1972 report. An infusion device was designed for analyzing the effect of various antibiotics in which tetracycline was shown to be better than penicillin-G. In field trials, all antibiotic formulas injected to old diseased pummelo trees with an air-pressured injector set at 80 lbs. could reduce disease index of HLB. Three applications of 1000

ppm tetracycline resulted in the best therapeutic efficacy. After treatments, pummelo trees recovered and produced normal fruits with good quality. This improved therapeutic procedure caused temporary phytotoxicity including vein browning, slender leaves, leaf scorching, and defoliation, but the injured trees would recover after half of a year.

Key words: Huanglongbing; pathogenicity; HLBB strains; chemotherapy; citrus cultivars

表 1. 柑橘黃龍病病菌系統之鑑別
Table 1. Pathological identification of HLBB strains using differential citrus cultivars

Strain	Differential cultivars of citrus			
	PM	LSO	WP	EL
I	3 /+++[a]	3 / +++	0 / -	0 / -
Ⅱ	3 / +++	3 / +++	3 / +++	3 / +++
Ⅲ	2 / ++	2 / ++	1 / +	0 / -
Ⅳ	0 / +	0 / +	0 / -	0 / -

[a] Disease index / PCR index

Notes: Disease index was graded 12 months after inoculation: 0, healthy looking without symptoms; 1, mild chlorotic symptoms; 2, intermediate symptoms including chlorosis, mottling with intermediate dwarfing; 3, typical greening symptoms including leaf yellow mottle and curling, vein-yellowing with distinct dwarfing. Pixel value (density count) index of the HLBB-specific band on agarose gel electrophoresis: -, pixel value< 50; +, 50 ~ <110; ++, 110 ~ < 170; +++, 170 ~ < 230; Differential cultivars were Ponkan mandarin (PM), Liucheng sweet orange (LSO), Wentan pummelo (WP) and Eureka lemon (EL).

表2. 各主要柑橘產區之黃化衰弱病株感染 HLB 及其與 CTV、CTLV 複合感染之比率
Table 2. Incidence of HLB and its complex infection with CTV and/or CTLV in yellow decline citrus trees

地點	品種	HLB 正反應株樹/檢測總株樹 (%)	HLB 與 CTV 或 CTLV 複合感染比率 (%)			
			HLB	HLB + CTV	HLB + CTLV	HLB+ CTV+ CTLV
1 新竹縣	椪柑	9/29 (31%)	0/9 (0%)	6/9 (66.7%)	0/9 (0%)	3/9 (33.3%)
	海梨柑	16/56 (29%)	0/16 (0%)	11/16 (68.8%)	0/16 (0%)	5/16 (31.2%)
	文旦	6/8 (75%)	4/6 (66.7%)	0/6 (0%)	2/6 (33.3%)	0/6 (0%)
2 苗栗縣	桶柑	13/49 (26.5%)	0/13 (0%)	9/13 (69.2%)	0/13 (0%)	4/13 (30.8%)
	椪柑	4/12 (33.3%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)
	文旦	5/6 (83.3%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
3 雲林縣	文旦	25/77 (32.5%)	11/25 (44%)	2/25 (8%)	12/25 (48%)	0/25 (0%)
	白柚	15/36 (41.7%)	9/15 (60%)	0/15 (0%)	6/15 (40%)	0/15 (0%)
	西施柚	7/18 (38.9%)	4/7 (57.1%)	0/7 (0%)	3/7 (42.9%)	0/7 (0%)
	柳橙	12/42 (28.6%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	0/12 (0%)	11/12 (91.7%)
4 宜蘭縣	金柑	12/115 (10.4%)	0/12 (0%)	4/12 (33.3%)	0/12 (0%)	8/12 (66.7%)
	文旦	7/7 (100%)	5/7 (71.4%)	0/7 (0%)	2/7 (28.6%)	0/7 (0%)
5 花蓮縣	文旦	29/93 (31.2%)	16/29 (55.2%)	1/29 (3.4%)	12/29 (41.4%)	0/29 (0%)
	葡萄柚	9/20 (45%)	0/9 (0%)	7/9 (77.8%)	0/9 (0%)	2/9 (22.2%)
	明尼桔柚	10/23 (43.5%)	1/10 (10%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)
6 嘉義縣	柳橙	10/26 (38.5%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)	9/10 (90%)
	文旦	3/4 (75%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
7 屏東縣	檸檬	28/53 (52.8%)	18/28 (64.3%)	0/28 (0%)	10/28 (35.7%)	0/28 (0%)
	紅江橙	37/127 (29%)	37/37 (100%)	0/37 (0%)	0/37 (0%)	0/37 (0%)

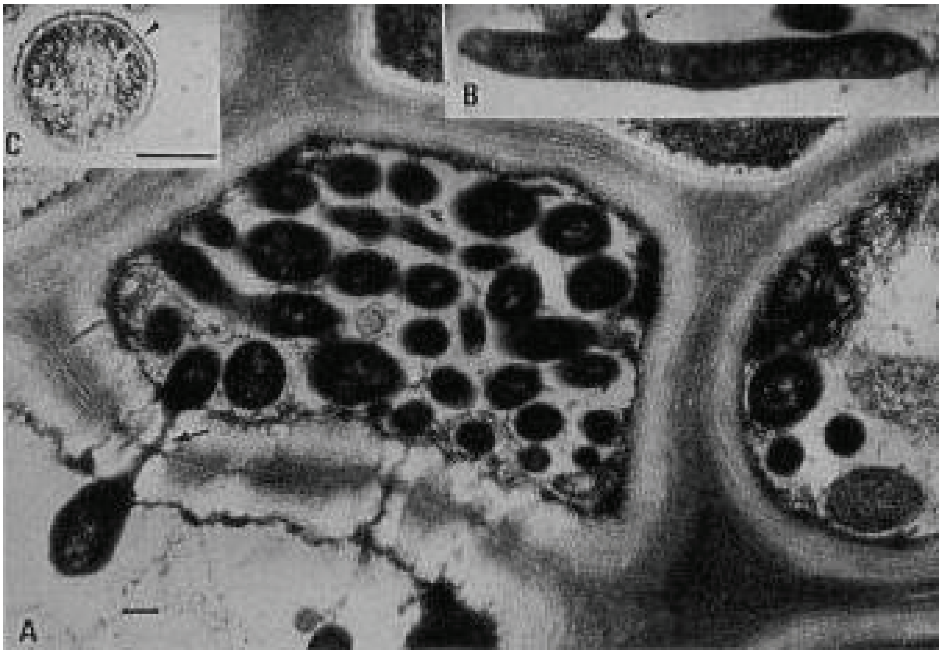

圖 1. 柑橘黃龍病菌之電顯圖。A 黃龍病原細菌於柑橘篩管細胞。B 表示為長桿狀菌體，側出芽生殖。C 為菌體橫切面，顯示具細胞壁與細胞膜。(黃及蘇, 1987)

Fig. 1. Electron micrograph of citrus Huanglongbing bacteria (HLBB). A. HLBB packed in sieve tube of Ponkan mandarin. B. The rod HLBB with side-budding. C. HLBB consisted of a cell wall and inner cytoplasmic membrane by cross-section. (Huang & Su, 1987)

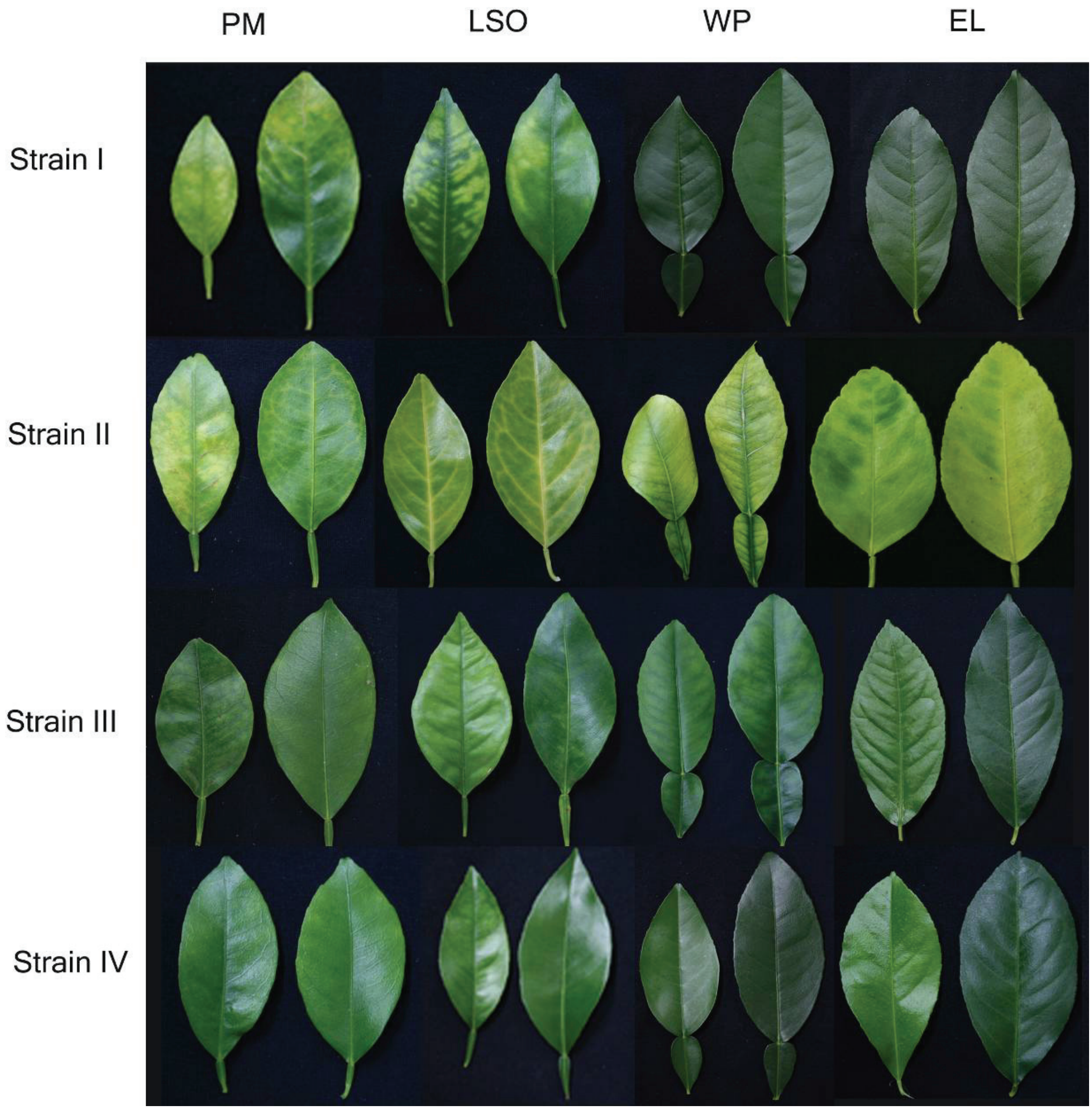

圖 2. 四種黃龍病菌系統於四種鑑別品種所引起之病徵。PM: 椪柑; LSO: 柳橙; WP: 文旦; EL: 尤利加檸檬。

Fig. 2. Different types and severities of the symptoms induced by the 4 HLBB strains (I~Ⅳ) in 4 differential citrus cultivars of Ponkan mandarin (PM), Liucheng sweet orange (LSO), Wentan pummelo (WP) and Eureka lemon (EL) under greenhouse conditions during 2005~2006.

圖 3. 六種田間常見之黃化褪色病徵型。第一型：輕度均勻褪色。第二型：葉肉對秤黃化，似缺鋅狀。第三型：葉肉不均勻褪色，似缺錳狀。第四型：葉脈黃化，葉肉仍呈綠色。第五型：整葉均勻黃化。第六型：整葉黃綠不均斑駁狀。

Fig. 3. Six types of chlorosis and yellow symptoms often observed in the field. Type 1: mild chlorosis. Type 2: Zinc- deficiency like symptom showing yellow blotches in mesophyll. Type 3: Manganese-deficiency like symptom showing chlorotic blotches in mesophyll. Type 4: uniform vein-yellowing. Type 5: whole leaf yellowing. Type 6: yellow mottling.

圖 4. 以改良式之耐高壓灌注器灌注抗生素於文旦病株。
Fig. 4. Transfusion of antibiotic solution by improved air-pressured plastic injector.